

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-155577

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月15日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/21		1/21	
9/04		9/04	Z
C 1 2 P 23/00		C 1 2 P 23/00	
// (C 1 2 N 15/09	Z N A		
審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-331936	(71) 出願人	591025303 農林水産省果樹試験場長 茨城県つくば市藤本2-1
(22) 出願日	平成9年(1997)12月2日	(71) 出願人	000195568 生物系特定産業技術研究推進機構 埼玉県大宮市日進町1丁目40番地2
		(72) 発明者	矢野 昌充 静岡県清水市興津本町318果樹試験舎
		(72) 発明者	大村 三男 静岡県静岡市小鹿3-4-5 合同宿舍小 鹿住宅8-36
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 β -カロテンハイドロキシラーゼ遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 β -カロテンハイドロキシラーゼ、該酵素をコードするDNAの提供。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質及び該タンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -カロテンハイドロキシラーゼ活性を有するタンパク質

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつβ-カロテンヒドロキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。 10

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつβ-カロテンヒドロキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項3】 配列番号1で表わされる塩基配列を含む、請求項2記載のDNA。

【請求項4】 請求項2又は3記載のDNAを含む組換えベクター。 20

【請求項5】 請求項4記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項6】 請求項5記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からβ-カロテンヒドロキシラーゼを採取することを特徴とするβ-カロテンヒドロキシラーゼの製造方法。

【請求項7】 請求項5記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からβ-クリプトキサンチンを抽出することを特徴とするβ-クリプトキサンチンの製造方法。 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、β-カロテンヒドロキシラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼをコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該ベクターによって形質転換された形質転換体並びにβ-カロテンヒドロキシラーゼ及びβ-クリプトキサンチンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】動植物や微生物が生成するカロテノイド類の中には、水酸基を有するいわゆるキサントフィルと称される一群の化合物が存在する。これらは出発物質のカロテノイドからヒドロキシラーゼ(hydroxylase)の触媒作用によって、以下の生合成経路によりβ-カロテンに水酸基が1個導入されてβ-クリプトキサンチンが、さらに1個水酸基が導入されてゼアキサンチンが生成する(図1、(1)の矢印)。

β-カロテン → β-クリプトキサンチン → ゼアキサンチン

すなわち、このβ-クリプトキサンチンは、β-カロテンに存在する2つのイオン環の片方に水酸基が導入されたものであり、さらに対称の位置に水酸基が導入されるとゼアキサンチンとなる(図1)。

【0003】多くの植物や微生物では、β-カロテンからゼアキサンチンへ代謝が進行するため、代謝経路の中間物質であって水酸基が1個のみ導入されたβ-クリプトキサンチンはほとんど生成されない。この反応はCrtZと呼ばれるヒドロキシラーゼ遺伝子が制御し、その酵素反応では2個の水酸基がほぼ同時に導入されると考えられている。例えば、エルビニア菌からクローニングされた遺伝子ではβ-カロテンに水酸基が2個導入されたゼアキサンチンが生成される。ところで、我が国の主要カンキツ系果物であるウンシュウミカンでは、β-カロテンに水酸基が1個導入されたβ-クリプトキサンチンは、最も重要なカロテノイドの一つであると考えられ、特に可食部において全カロテノイドの60～70%を占めている。

【0004】このようなウンシュウミカンのβ-クリプトキサンチンの含有量を考慮すると、ウンシュウミカンのβ-クリプトキサンチンは、これまでにクローニングされた前記代謝経路に関する遺伝子により生成されているとは考えにくい。また、既にクローニングされた遺伝子によってβ-クリプトキサンチンが生成されるか否かについては未だ不明である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、β-カロテンヒドロキシラーゼ及び当該酵素をコードする遺伝子を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、カンキツ由来cDNAライブラリーよりβ-カロテンヒドロキシラーゼをコードするDNAを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質である。

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつβ-カロテンヒドロキシラーゼ活性を有するタンパク質 40

さらに、本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAである。

【0007】(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつβ-カロテンヒドロキシラーゼ活性を有するタンパク質 50

さらに、本発明は、配列番号1で表わされる塩基配列を含む、β-カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNAである。さらに、本発明は、前記DNAを含む組換えベクターである。さらに、本発明は、前記組換えベクターによって形質転換された形質転換体である。

【0008】さらに、本発明は、前記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からβ-カロテンハイドロキシラーゼを採取することを特徴とするβ-カロテンハイドロキシラーゼの製造方法である。さらに、本発明は、前記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からβ-クリプトキサンチンを抽出することを特徴とするβ-クリプトキサンチンの製造方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明は、図1の(2)の矢印の反応を触媒するβ-カロテンハイドロキシラーゼ及び当該β-カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNAに関するものである。本発明のcDNAは、まず、バクテリア由来のβ-カロテンハイドロキシラーゼをコードする遺伝子の保存領域を基にしてプライマーを作製し、カンキツ(宮川早生温州)果実(砂じょう)及び花由来first-strand cDNAを鋳型として3' RACE RT-PCRを行ってウンシュウミカンβ-カロテンハイドロキシラーゼcDNAを得、続いて当該cDNAをプローブとして用いてウンシュウミカン可食部由来cDNAライブラリーより単離することができる。

【0010】1. β-カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNAのクローニング

(1)プライマーの作製

まず、後述の3' RACE RT-PCRを行うためのプライマーを作製する。目的のDNAに対してより特異性の高いプライマーを作製するためには、各細菌と植物との間でアミノ酸残基の保存性の高い領域をコードするオリゴヌクレオチドを作製するのが適当である。なお、プライマーは、通常の化学合成により得ることができる。この条件に合うものとして、例えば以下の保存アミノ酸配列を選択する。

i) 「Phe Glu Leu Asn Asp Val Phe Ala」(配列番号3)

ii) 「His Asp Gly Leu Val His」配列(配列番号4)

【0011】ここに示したアミノ残基における保存性の高い2つの領域は互いに近傍に位置することから、それぞれの保存領域をセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして用いてPCRを行うことができない。そこで、本発明では、それぞれの配列をいずれもセンスプライマーとして用いる3' RACE RT-PCR法を採用することにした。ここで上記配列は、文献：Zairen Sun et.al. The Journal of Biological Chemistry, 1996; Vol.271, no.40; 24349-2435およびNakagawa M. and N. Misawa Agric. Biol. Chem 55:2147-2148に記載されたアラビドプシスおよびErwinia由来β-カロテンハイドロキシラーゼのアミノ酸配列内の領域である。これらのアミノ酸配

列を基にして、例えば以下の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを作製する。但し、プライマーはこれらの配列に限定されるものではない。

センス1プライマー(Bech-a)：TT(t/c)GA(q/a)CTAAA(c/t)GA(t/c)GTN(配列番号5)

センス2プライマー(Bech-b)：CACGA(c/t)GGTCTNGTNC(配列番号6)

【0012】(2) 3' RACE RT-PCR

次に、合成した2つのセンスプライマーを用いて3' RACE RT-PCRを行う。RT-PCR(reverse transcription-PCR法)とは、逆転写酵素を用いてRNAを鋳型としたDNAの合成反応(逆転写)をあらかじめ行い、その合成されたDNAをあらかじめ鋳型としてPCRを行う方法である。また、3' RACE(Rapid Amplification of cDNA ends)とは、既知領域の塩基配列情報をもとにRT-PCRを行って、cDNA末端までの未知領域をクローニングする方法である。まず、5'末端にアダプター配列の付いたオリゴ(dT)をプライマーにして逆転写反応を行い、第一鎖cDNA(first-strand cDNA)を合成する。得られたfirst-strand cDNAは、全てアダプター配列が末端に付いた構造をしている。このため、クローニングを目的とするcDNAは、未知領域が既知配列とアダプター配列に挟まれた形になる。そこで、既知配列の一部をセンスプライマーとして、アダプタープライマーとともにPCRを行うことによって、両者に挟まれた未知領域(cDNA部分配列)を増幅することが可能となる。なおRT-PCRは、市販のキット(T-Primed First-Strand Kit: Pharmacia)を用いて行うことができる。

【0013】(3) cDNAライブラリーの作製

前記のようにして得られたcDNA部分配列をプローブとして果実由来cDNAライブラリーから目的とするcDNA全長配列を得るため、そのライブラリーの作製を以下に行う。カンキツ各器官又は組織(果実、葉、根、花、カルス等)からグアニジン試薬又はSDS-フェノール等を用いて全RNAを単離し、オリゴdT-セルロース又はセファロース2Bを担体とするポリU-セファロース等を用いたアフィニティークラム法により、あるいはオリゴテックス樹脂を用いる方法によりmRNAを調製する。得られたmRNAを鋳型として、逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成した後、この一本鎖から二本鎖cDNAを合成する。この二本鎖cDNAを適当なプラスミド又はファージベクターにリガーゼを用いて連結し、組換え体DNAを得る。組換え体DNAを用いて大腸菌等に感染または形質転換することにより、ブランクやコロニーによりスクリーニングが可能なcDNAライブラリーを得ることができる。

【0014】(4) cDNAライブラリーからのβ-カロテンハイドロキシラーゼcDNAホモログの単離

続いて、上述した3' RACE RT-PCRにより単離された配列をプローブに用いて、ブランクハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションにより全長cDNA配列

をスクリーニングする。ハイブリダイゼーションは、例えば市販のキット (ECL nucleic acid labelling and detection system (Amersham)) 等を使用することができる。

【0015】(5)塩基配列の決定

得られたクローンについて塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキシム-ギルバート法、ジデオキシ法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定装置を用いて配列決定が行われる。配列番号1に本発明のDNAの塩基配列を、配列番号2に本発明のβ-カロテンハイドロキシラーゼのアミノ酸配列を例示するが、このアミノ酸配列からなるタンパク質がβ-カロテンハイドロキシラーゼ活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。例えば、配列番号2で表わされるアミノ酸配列の第1番目のMetが欠失したものなども、本発明のタンパク質に含まれる。ここで、本発明におけるβ-カロテンハイドロキシラーゼ活性とは、β-カロテンからβ-クリプトキサンチンを生成する触媒反応を担う活性を意味する。一旦本発明のDNAの塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、あるいは当該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のDNAを得ることができる。

【0016】2. 組換えベクター及び形質転換体の作製 (1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明のDNAを連結(挿入)することにより得ることができる。本発明のDNAを挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA等が挙げられる。プラスミド DNAは、大腸菌やアグロバクテリウムからアルカリ抽出法(Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) Nucleic acid Res 7: 1513)又はその変法等により調製することができる。また、市販のプラスミドとして、例えばpBluescript II SK+ (Stratagene社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pUC119 (宝酒造社製)、pGEM-T (Promega社製)等を用いてもよい。これらのプラスミドは、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が含まれていることが好ましい。ファージ DNAとしては、例えば M13mp18、M13mp19等が挙げられる。ベクターに本発明のDNAを挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。本発明のDNAは、そのDNAの機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、本発明のDNAのほか、ターミネーター、リボソーム結合配列等を組み込んでもよい。

【0017】(2)形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のエッシャーヒア属、バチルス属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の酵母、あるいはCOS細胞、CHO細胞等の動物細胞等が挙げられる。大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該宿主中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0018】発現ベクターとしては、例えばpBluescript IIベクター、pETベクター (Stratagene社製) 等が用いられる。プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、P_Lプロモーター、P_Rプロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されない。例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110-2114 (1972)) 等が挙げられる。酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばYEpl3、YEpl24、Ycp50等が用いられる。この場合のプロモーターとしては、酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばgal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MFα1プロモーター等が挙げられる。

【0019】酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法 (Methods. Enzymol., 194, 182-187 (1990))、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 1929-1933 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) 等が挙げられる。動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNA1/Amp (Invitrogen社) 等が用いられる。この場合、プロモーターとしてヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。なお、本発明の組換えベクターは、大腸菌に導入され (名称: EpCitBECH1)、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、FERM BP-6188としてブダベスト条約に基づき国際寄託されている。

【0020】3. β-カロテンハイドロキシラーゼの生産

50 本発明のβ-カロテンハイドロキシラーゼは、前記形質

転換体を培地に培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0021】炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステイプリカー等が用いられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

【0022】培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好気的条件下、28℃で48～60時間行う。培養期間中、pHは7.0～7.5に保持する。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液等を用いて行う。なお、大腸菌を宿主として培養を行う場合は、大腸菌内にpACCAR16 ΔcrtXプラスミド（ファルネシルニリン酸からβ-カロテンまでが生成できる、4つのエルビニア(Erwinia)属に属する微生物由来の遺伝子を持つ）と共存させて培養を行うことが好ましい。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0023】プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常、5% CO₂存在下、37℃で1～2日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0024】培養後、本発明のβ-カロテンハイドロキシラーゼが菌体内又は細胞内に生産される場合には菌体又は細胞を破碎等することによりβ-カロテンハイドロキシラーゼを採取する。また、本発明のβ-カロテンハ

イドロキシラーゼが菌体外又は細胞外に生産される場合には培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去した後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせる用いることにより、培養物中から本発明のβ-カロテンハイドロキシラーゼを単離精製することができる。最終的に得られたタンパク質がβ-カロテンハイドロキシラーゼであることの確認は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等により行うことができる。

【0025】4. β-クリプトキサンチンの生産

本発明では、β-カロテンハイドロキシラーゼを精製した手法と同様にしてβ-クリプトキサンチンを生産することもできる。すなわち、前記形質転換体を培地に培養し、その培養物からβ-クリプトキサンチンを抽出するものである。培養方法については、前記「3. β-カロテンハイドロキシラーゼの生産」の項に記載の方法と同様である。培養後、遠心分離等により菌体又は細胞を除去した後、例えばHPLC等を用いることにより、培養物中からβ-クリプトキサンチンを抽出することができる。最終的に抽出された物質がβ-クリプトキサンチンであることの確認は、¹H-NMR、紫外-可視スペクトル、質量分析法等により行うことができる。

【0026】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】β-カロテンハイドロキシラーゼをコードするcDNAのクローニング

(1) 3'RACE RT-PCR法を用いた目的部分cDNAのクローニング

まずプライマーとしてNotI-d(T)₁₈ (5'[AACTGGAAGAAATTC GCGGCCGACAGGAAT₁₈]-3') (配列番号7)を用い、カンキツ(宮川早生温州)果実(砂じょう)および花由来RNAを鋳型として逆転写反応を行い、1st-strand cDNAを作製した。なお、全ての1st-strand cDNA断片の3'末端には合成時にNotIアダプター配列(TCGAAGAATTCGCGGCCGCA G; 配列番号8)を付加した構造にしてある。この1st-strand cDNAを鋳型にセンス1プライマーとアダプタープライマーを用いて3'-RACE法を行う。PCRは、94.5℃で40秒(変性)及び60℃で2分(アニール/伸長)の反応を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。しかしこの第一段階のPCRでは、用いた2つのプライマーのうち一方のアダプタープライマーは逆転写反応によって生成された全cDNAに共通に含まれる配列となる。したがってこの段階で得られるPCR産物は、非特異的に増幅されるDNAが多く含まれる。そこで、目的のDNAを特異的に増幅するため、センス2プライマーを用いて第2段階のPCRを行

った。第2段階のPCRは、94.5°Cで35秒(変性)、55°Cで45秒(アニール)及び72°Cで1分(伸長)の反応を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。なお、RT-PCRは市販のキット(T-Primed First-Strand Kit: Pharmacia)を用いて行った。以上のようにして、カンキツβ-カロテンハイドロキシラーゼをコードするcDNA部分配列を得た。

【0027】(2)カンキツ果実組織由来cDNAライブラリーの作製

宮川早生温州の果実(砂じょう組織)から、グアニジンチオシアネートを用いて全RNAを単離した。単離された全RNAからOligotex-dT30[Super](TaKaRa)を用いてmRNAに精製後、oligo(dT)₁₂₋₁₈プライマーとMoloney Murine Leukemia Virus(MMLV)由来の逆転写酵素によって、first-strand cDNAを合成し、さらにDNAポリメラーゼによって第二鎖(second-strand)が合成された(Pharmacia)。この2本鎖cDNAにEcoRIアダプターをT4-DNAリガーゼによって付加し、Uni-ZAP EcoRI ファージミドベクター(STRATAGENE)へのライゲーションを行った。

【0028】(3)ブラークハイブリダイゼーションによる目的全長cDNAのスクリーニング

続いて、上述した3' RACE RT-PCRにより単離されたカンキツβ-カロテンハイドロキシラーゼをコードするcDNA部分配列をプローブとして、ブラークハイブリダイゼーションにより全長cDNA配列をスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは市販のキット(ECL nucleic acid labelling and detection system (Amersham))を使用した。スクリーニング(3x10⁶ pfc)の結果、推定分子量34.7kDa、311残基のアミノ酸をコードする全長1158bpのβ-カロテンハイドロキシラーゼcDNAホモログを単離した。このクローンは、アラビドプシスから単離されているβ-カロテンからゼアキサンチンを生成するβ-カロテンハイドロキシラーゼcDNAと76.3%の相同性を示し、バクテリア由来のゼアキサンチンを生成するβ-カロテンハイドロキシラーゼ遺伝子とは、35.7%~39.8%の相同性を示した。このクローンを「CitBECH1」と命名した。CitBECH1の塩基配列は、配列番号1で示し、またCitBECH1によりコードされるアミノ酸配列は、配列番号2で示した。

【0029】なお、従来のβ-カロテンハイドロキシラーゼと本発明のβ-カロテンハイドロキシラーゼとの間におけるホモロジーを比較した結果を図3に示す。図3において、最上部(CitBECH1)が本発明の遺伝子によりコードされるβ-カロテンハイドロキシラーゼのアミノ酸配列である。その他は類縁の遺伝子によりコードされるアミノ酸配列であり、いずれもβ-カロテンからβ-クリプトキサンチンを通り越してゼアキサンチンを生成する酵素のアミノ酸配列である。

【0030】〔実施例2〕β-カロテンハイドロキシラーゼを有する大腸菌でのβ-クリプトキサンチンの生産

(1)本発明のDNAの発現

単離したクローンをアンピシリン耐性遺伝子を有するpBluescript II SK+プラスミドに挿入後、大腸菌内でpACCAR16ΔcrtXプラスミド(ファルネシルリニン酸からβ-カロテンまでが生成できる、4つの由来の遺伝子を持つ)と共存させて培養を行った。培養は、LB培地に大腸菌をまき、28°Cで60時間培養を行った。次に、培養物についてアセトン抽出を行った。この形質転換体からのアセトン抽出液についてHPLC(システム:日本分光)を行った。HPLCは、カラムとしてYMC製C30を用い、溶離A液としてメタノール/メチル-tert-ブチルエーテル/水を81/15/4の比で混合したものを、溶離B液としてメタノール/メチル-tert-ブチルエーテルを10/90の比で混合したものを使用した。また、グラジエント条件は、スタート時はA液100%、70分後はA液20%及びB液80%とし、流速は1.0ml、カラム温度は22°C、検出波長は450nmで分析した。

【0031】その結果、図2に示すクロマトグラムが得られた。得られたピークをフナコシ製のカロテノイド標準品と対比したところ、本大腸菌の生成したカロテノイドの比率はβ-クリプトキサンチン、β-カロテン、ゼアキサンチンが43:22:11であった。この結果から、カンキツ由来β-カロテンハイドロキシラーゼは主にβ-クリプトキサンチンを生成すると判断した。

【0032】(2)β-クリプトキサンチンの精製及び同定

プラスミドpCitBECH1をβ-カロテン産生大腸菌JM101に導入したもの(大腸菌(PACCAR16ΔcrtX, pCitBECH1)) (黄色を呈している)を、150μg/mlのアンピシリン(Ap)及び30μg/mlのクロラムフェニコール(Cm)を含む2xYT培地(1.6%トリプトン、1%イーストエキス、0.5%NaCl)1.6リットル中、30°Cで28時間培養した。培養液から集菌した菌体を360mlのアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200mlのクロロホルム/メタノール(9/1)で2回抽出し、濃縮乾固した。さらにこれを少量のクロロホルム/メタノール(9/1)に溶解した後、メルク社製の分取用シリカゲルTLCプレートを用いて、クロロホルム/メタノールで展開することにより、薄層クロマトグラフィー(TLC)を行った。

【0033】その結果、元の色素は、このTLCにより頂点のβ-カロテンのスポット以外にRf値0.4(濃い)及び0.1(非常に薄い)の2つのスポットに分かれた。そこで、濃い黄色色素であるRf 0.4の色素をTLCプレートからかきとった後、少量のクロロホルム/メタノール(1/1)に溶解し、TOYOPEARL HW-40カラムクロマトグラフィーで展開溶出することにより、純品を1mg得た。本色素は、紫外-可視スペクトル(λ 425, 448, 475nm, メタノール中)、FD-MSスペクトル(m/e 553, [M]⁺)の結果よりβ-クリプトキサンチンであると考えられた。さらに、¹H-NMRスペクトルにより、3-ヒドロキシ

-β-イオン環及びβ-イオン環の2つのシグナル (G. Englert, N.M.R. of carotenoids, Edited by G. Britton, T.W. Goodwin, Carotenoid Chemistry and Biochemistry) が確認された。

【0034】従って、本色素をβ-クリプトキサンチンであると同定した(図2)。図2は、本発明の遺伝子のβ-クリプトキサンチン生合成への関与を示している。図2において、上段の図はエルビニア菌のβ-カロテン生合成系遺伝子を組み込んだ大腸菌から生成されたカロテノイドを、中段の図は上記大腸菌に本発明の遺伝子を組み込んで生成させたカロテノイドを、そして下段の図はゼアキサンチン、β-クリプトキサンチン及びβ-カロテンの標準品を、それぞれ高速液体クロマトグラフィーで分析した結果である。図2の結果から、本発明の遺伝子によりコードされるβ-カロテンハイドロキシラーゼは、エルビニア菌や海洋細菌など公知の遺伝子Crt Zによりコードされる公知のβ-カロテンハイドロキシラーゼとは異なり、β-クリプトキサンチンを主に生成し、ゼアキサンチンを少量しか生成しないように触媒するものであることがわかる(図2中段)。

【0035】

【発明の効果】本発明により、β-カロテンハイドロキ *

＊シラーゼ、β-カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNA、当該DNAを含む組換えベクター、当該ベクターによって形質転換された形質転換体並びにβ-カロテンハイドロキシラーゼ及びβ-クリプトキサンチンの製造方法が提供される。本発明のβ-カロテンハイドロキシラーゼは、カンキツ果実およびその加工品の品質及び機能を保つために必要かつ重要な物質である色素(β-クリプトキサンチン)の生成を触媒する点で有用である。

10 【0036】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1158

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：Citrus unshiu

20 配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：87..1019

配列

```

CCACAATCCA CTTCACATCA ACTCTTCCTC TTTTCAAGTG CTTTACTCT AAAACCCAAA   60
ACCTCGTAAA CAAACAAAAC CCCACC ATG GCG GTC GGA CTA TTG GCC GCC ATA   113
Met Ala Val Gly Leu Leu Ala Ala Ile
1 5
GTC CCG AAG CCC TTC TGT CTC CTC ACA ACA AAA CTT CAA CCC TCT TCG   161
Val Pro Lys Pro Phe Cys Leu Leu Thr Thr Lys Leu Gln Pro Ser Ser
10 15 20 25
CTC CTC ACA ACA AAA CCC GCT CCC CTT TTT GCC CCT CTC GGT ACC CAC   209
Leu Leu Thr Thr Lys Pro Ala Pro Leu Phe Ala Pro Leu Gly Thr His
30 35 40
CAT GGC TTC TTT AAT GCG AAA AAC CGA AGA AAA CTC AAC TCT TTC ACC   257
His Gly Phe Phe Asn Gly Lys Asn Arg Arg Lys Leu Asn Ser Phe Thr
45 50 55
GTA TGT TTT GTT TTA GAG GAG AAA AAA CAA AGC ACC CAG ATC GAG ACT   305
Val Cys Phe Val Leu Glu Glu Lys Lys Gln Ser Thr Gln Ile Glu Thr
60 65 70
TTC ACG GAC GAG GAG GAG GAG TCG GGT ACC CAG ATC TCG ACT GCT   353
Phe Thr Asp Glu Glu Glu Glu Glu Ser Gly Thr Gln Ile Ser Thr Ala
75 80 85
GCC CCC GTG CCC GAG AAA TTG GCG AGA AAG AGA TCC GAG AGG TTC ACT   401
Ala Arg Val Ala Glu Lys Leu Ala Arg Lys Arg Ser Glu Arg Phe Thr
90 95 100 105
TAT CTC GTT GCT GCC GTC ATG TCT AGT TTT GGT ATC ACT TCC ATG GCT   449
Tyr Leu Val Ala Ala Val Met Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala
110 115 120
GTC ATG GCT GTT TAT TAC ACG TTC TGG TGG CAA ATG GAG GGT GGA GAG   497
Val Met Ala Val Tyr Tyr Arg Phe Trp Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu

```

(8)

特開平11-155577

13 125 130 135 14 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310

GTG CCT TTA GCT GAA ATG TTT GCC ACA TTT GCT CTC TCT GTT GGT GCT 545
Val Pro Leu Ala Glu Met Phe Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala

GCT GTG GGC ATG GAG TTT TGG GCA CGA TGG GCT CAT AAA GCT CTG TGG 593
Ala Val Gly Met Glu Phe Trp Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp

CAT GCT TCT TTA TGG CAT ATG CAC GAG TCT CAC CAT CGA CCA AGA GAG 641
His Ala Ser Leu Trp His Met His Glu Ser His His Arg Pro Arg Glu

GGT CCT TTT GAG CTA AAC GAT GTG TTT GCC ATA ATC AAC GCA GTT CCA 689
Gly Pro Phe Glu Leu Asn Asp Val Phe Ala Ile Ile Asn Ala Val Pro

GCC ATA GCC CTT CTC TCT TTT GGC TTC TTC CAC AAA GGC CTT GTA CCT 737
Ala Ile Ala Leu Leu Ser Phe Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Val Pro

GGT CTC TGC TTT GGT GCT GGA CTT GGC ATT ACG GTG TTT GGG ATG GCC 785
Gly Leu Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala

TAC ATG TTC GTC CAC GAT GGT CTC GTT CAC AAA AGG TTC CCT GTG GGT 833
Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly

CCC ATT GCC GAC GTG CCT TAT TTC CGG AGA GTC GCT GCG GCT CAC CAG 881
Pro Ile Ala Asp Val Pro Tyr Phe Arg Arg Val Ala Ala Ala His Gln

CTT CAC CAC TCG GAT AAA TTC CAC GGT GTT CCA TAT GGG CTC TTT CTC 929
Leu His His Ser Asp Lys Phe His Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Leu

GGA CCT AAG GAG CTT GAA GAA GTG GGG GGA CTA GAA GAA TTG GAG AAG 977
Gly Pro Lys Glu Leu Glu Glu Val Gly Gly Leu Glu Glu Leu Glu Lys

GAG ATC AGT AAG AGA ATC AAA TCA TAC AAC AGG GTT CCA AAA 1019
Glu Ile Ser Lys Arg Ile Lys Ser Tyr Asn Arg Val Pro Lys

TAATCAATTT AATGGGAGGA CCAATTTTGT GATCAATTTG TCAGTGTACA GAAACAATAG 1079
TGTTATTAAT GAAAAAATA AATTATGAAT GCTTATGGGT GGATTACTGT TGTAAAGTTT 1139
ATGATGTAA ATAATATAT 1158

【0037】配列番号：2

＊トポロジー：直鎖状

配列の長さ：311

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

＊40

配列

Met Ala Val Gly Leu Leu Ala Ala Ile Val Pro Lys Pro Phe Cys Leu
1 5 10 15
Leu Thr Thr Lys Leu Gln Pro Ser Ser Leu Leu Thr Thr Lys Pro Ala
20 25 30
Pro Leu Phe Ala Pro Leu Gly Thr His His Gly Phe Phe Asn Gly Lys
35 40 45
Asn Arg Arg Lys Leu Asn Ser Phe Thr Val Cys Phe Val Leu Glu Glu
50 55 60
Lys Lys Gln Ser Thr Gln Ile Glu Thr Phe Thr Asp Glu Glu Glu Glu

(9)

特開平 1 1 - 1 5 5 5 7 7

15 16

65 70 75 80

Glu Ser Gly Thr Gln Ile Ser Thr Ala Ala Arg Val Ala Glu Lys Leu

85 90 95

Ala Arg Lys Arg Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu Val Ala Ala Val Met

100 105 110

Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met Ala Val Tyr Tyr Arg

115 120 125

Phe Trp Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro Leu Ala Glu Met Phe

130 135 140

Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Gly Met Glu Phe Trp

145 150 155 160

Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala Ser Leu Trp His Met

165 170 175

His Glu Ser His His Arg Pro Arg Glu Gly Pro Phe Glu Leu Asn Asp

180 185 190

Val Phe Ala Ile Ile Asn Ala Val Pro Ala Ile Ala Leu Leu Ser Phe

195 200 205

Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Val Pro Gly Leu Cys Phe Gly Ala Gly

210 215 220

Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly

225 230 235 240

Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Ile Ala Asp Val Pro Tyr

245 250 255

Phe Arg Arg Val Ala Ala Ala His Gln Leu His His Ser Asp Lys Phe

260 265 270

His Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Leu Gly Pro Lys Glu Leu Glu Glu

275 280 285

Val Gly Gly Leu Glu Glu Leu Glu Lys Glu Ile Ser Lys Arg Ile Lys

290 295 300

Ser Tyr Asn Arg Val Pro Lys

305 310

【 0 0 0 0 】配列番号 : 3

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Phe Glu Leu Asn Asp Val Phe Ala

1 5

【 0 0 3 8 】配列番号 : 4

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

TTYGARCTAA AYGAYGTN

【 0 0 4 0 】配列番号 : 6

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

*

配列

His Asp Gly Leu Val His

1 5

【 0 0 3 9 】配列番号 : 5

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

40 配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列の特徴

*

18

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列の特徴

50

(10)

特開平11-155577

17

18

配列

CACGAYGGTC TNGTNCA

17

【0041】配列番号: 7

※トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 27

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

配列の特徴

鎖の数: 一本鎖

*

配列

AACTGGAAGA ATTCGCGGCC GCAGGAA

27

【0042】配列番号: 8

※トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 21

10 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

配列の特徴

鎖の数: 一本鎖

※

配列

TGGAAGAATT CGCGCCGCA G

21

【図面の簡単な説明】

★ある。

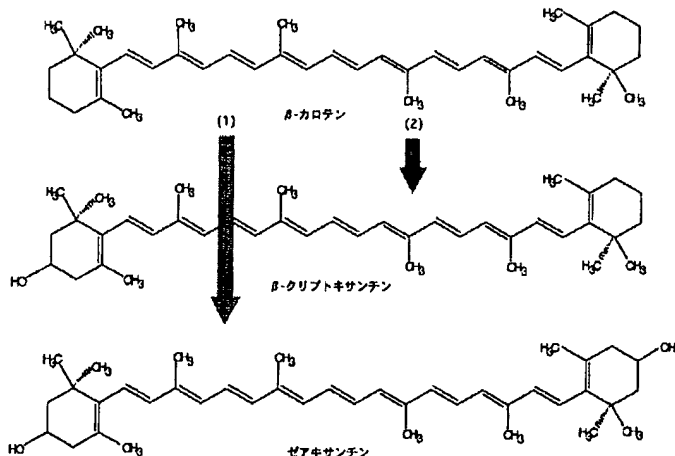
【図1】カロテノイド類の生合成系を示す図である。

【図3】β-カロテンヒドロキシラーゼと他の酵素と

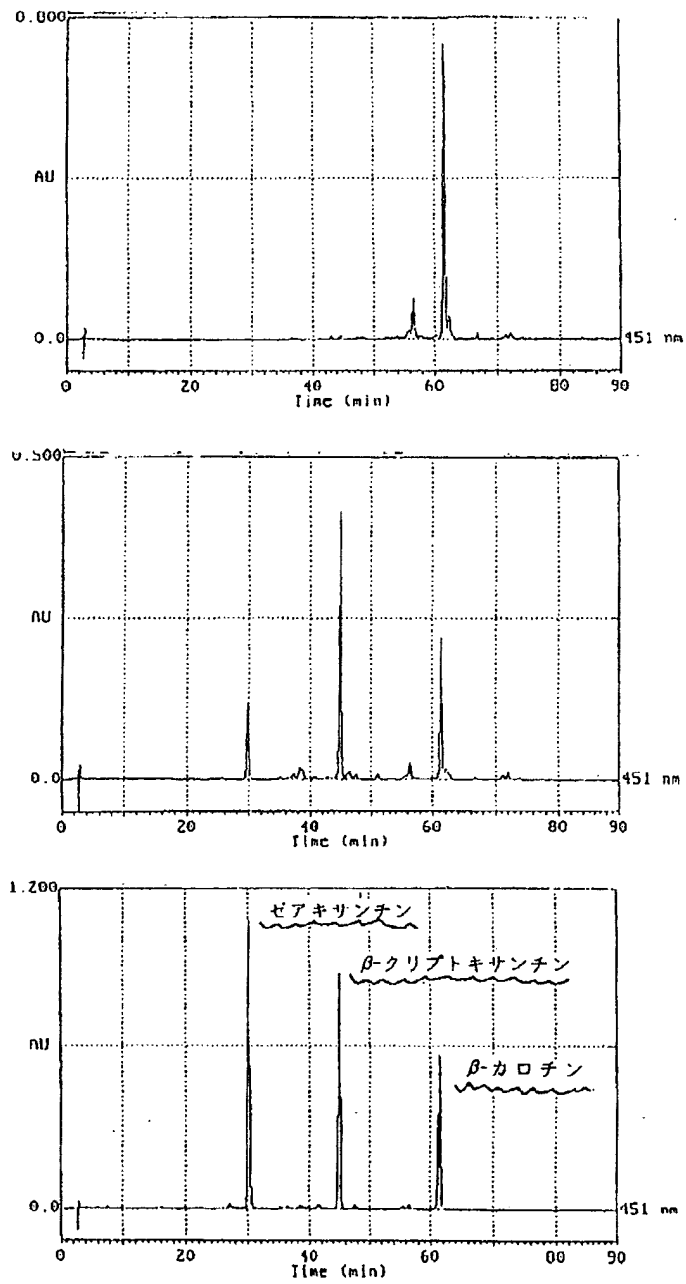
【図2】高速液体クロマトグラフィーの結果を示す図で★

の間でアミノ酸配列のホモロジーを比較した図である。

【図1】



【図2】



【図3】

Peptide	
Score Table: Unitary Matrix	
GAP Penalty: -4	
CitBECH1	1:NAVGLLAIVKPFCLLTQLQPSLLTTKPAIPLEAPLGTGHHGFGKRRKLSFTVCVLEKKQSTQIETFTDEEEESGTQISTA-
Arabidopsis	1:-----FSSSTDFRLR.PKSLSG.-SPSL.-FKR.S.Y.V..RR.NSP..NDERP.STS.TNA.DAEY
Agrobacterium aurantiacum-crtZ	1:-----
Alicagenes sp-crtZ	1:-----
Erwinia herbicola crtZ	1:-----
Erwinia uredovora-crtZ	1:-----
CitBECH1	91:-A-RVAEKLARKRSERFTYLVAAVSSFGITSMVNAVYYRFWQNEGGEVPLAEKFCGTALSVGAAGNEFWARWAKALWHLWHHH
Arabidopsis	91:L.L.L...E.K.S..I.ML.....S.....ISML.....R.....N..
Agrobacterium aurantiacum-crtZ	91:-----TNFLIVATVL.MELTAYSVHRWIMHGPLG.GW..
Alicagenes sp-crtZ	91:-----TQFLIVATVL.MELTAYSVHRWIMHGPLG.GW..
Erwinia herbicola crtZ	91:-----MLVNSLIVLSVIAIEGIA.FTHRYIMHG-WG.RW..
Erwinia uredovora-crtZ	91:-----MLVNSLIVLSVIAIEGIA.FTHRYIMHG-WG.RW..
CitBECH1	181:ESHRRPRECFELNDVFAITNAVPAITALLSEGFHKLVPGLCFGAGLCITVFGMAYFVHDGLVHKRFPGPIADVPYFRRVAAAHQLH
Arabidopsis	181:K.....K.....V.G...G...Y..N.....I.....L.K.....
Agrobacterium aurantiacum-crtZ	181:K...EEDHAL.K.LYGLVF..I.TV.FTV.WTAPVLWM---IA.M.Y.LI.FVL.....Q.W.FRY.PRKG.A..LYQ..R..
Alicagenes sp-crtZ	181:K...EEDHAL.K.LYGLVF..I.TV.FTV.WTAPVLWM---IA.M.Y.LI.FIL.....Q.W.FRY.PRKG..LYQ..R..
Erwinia herbicola crtZ	181:....T..K.V....L..VVF.CV....I.V.TAGVWPLQW---I.C.M.Y.LL.FL.....Q.W.FHW.PRKG.LK.LYV..R..
Erwinia uredovora-crtZ	181:L...E..K.A..V..LY.VVF.ALS.L.IYL.STGHWPLQW---I.A.M.AY.LL.FM.....Q.W.FRY.PRKG.LK.LYM..RW..
CitBECH1	271:HSDFEHGVPYGLFLGPKLEEVGGLLEELEKEISKRISYNRPVK
Arabidopsis	271:T...N.....N...D....R.....KKASGSGSSSSS
Agrobacterium aurantiacum-crtZ	271:..AVEGRDHCVSFGFIYAPPVVKLQDLKMSGVLRAEAQERT
Alicagenes sp-crtZ	271:..AVEGRDHCVSFGFIYAPPVVKLQDLKMSGVLRAEAQERT
Erwinia herbicola crtZ	271:..AVREGCVSFGFIYARKPADLQATLR.RHGRPPKRDAAKDRPDAA SPSSSSPE
Erwinia uredovora-crtZ	271:..AVREGCVSFGFIYAPPLSKLQATLR.RHGARAARDAQGEDEPASGK

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C 12 R 1:91)

(C 12 N 1/21

識別記号

F I

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/04

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 23/00

C 1 2 R 1:19)

(72)発明者 生駒 吉識

静岡県清水市折戸1-20-1 合同宿舎三
保第1住宅1-33

(72)発明者 小松 晃

静岡県清水市興津中町1126-2-303

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.